

SEPARATION AND PURIFICATION OF POLYHYDROXYALKANOATE

Patent Number: JP7079787
Publication date: 1995-03-28
Inventor(s): YAMAMOTO OSAMU; others: 02
Applicant(s): DENKI KAGAKU KOGYO KK
Requested Patent: ☒ JP7079787
Application Number: JP19930227070 19930913
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P7/62
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To separate and purify a polyhydroxyalkanoate useful for coating material, etc., in high efficiency by treating a microorganism containing a polyhydroxyalkanoate with a buffer solution containing a surfactant for keeping the alkanoate in amorphous state.

CONSTITUTION: A polyhydroxyalkanoate is separated and purified in high efficiency while suppressing the crystallization by culturing a microorganism (e.g. *Alcaligenes eutrophus* ATCC17699) containing a polyhydroxyalkanoate (e.g. polyhydroxybutyrate), substituting the culture liquid with 50mM tris-HCl buffer solution by an ultrafiltration apparatus, adding a surfactant (e.g. sodium oleate) to the solution, solubilizing the cell wall component by adding lysozyme, centrifuging the reaction liquid to recover the solid component, suspending the solid component in 50mM tris-HCl buffer solution containing a surfactant, treating with pronase while keeping the polyhydroxyalkanoate in amorphous state and finally separating the treated product by centrifugal separation.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-79787

(43) 公開日 平成7年(1995)3月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62		7432-4B		
// A 6 1 K 9/30				

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平5-227070	(71) 出願人	000003296 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号
(22) 出願日	平成5年(1993)9月13日	(72) 発明者	山本 修 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	宮田 喜明 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	柳 慎一 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社総合研究所内

(54) 【発明の名称】 ポリヒドロキシアルカノエートの分離精製法

(57) 【要約】

【構成】 ポリヒドロキシアルカノエートを含有する微生物よりポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する際に、界面活性剤を用いてポリヒドロキシアルカノエートが実質的にアモルファス状態を保持することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分離精製法。

【効果】 本発明の方法によれば、ポリヒドロキシアルカノエートの結晶化を抑制して分離精製することができるので、コーティング材料としてより適したものを得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリヒドロキシアルカノエートを含有する微生物よりポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する際に、界面活性剤を用いてポリヒドロキシアルカノエートが実質的にアモルファス状態を保持することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分離精製法。

【請求項2】 用いる界面活性剤は、疎水親水性バランス（HLB）が25以下であり、濃度が臨界ミセル濃度（CMC）の10倍以上で、酵素反応を阻害しない濃度である請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ポリヒドロキシアルカノエートを含有する微生物より、ポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する際に、界面活性剤を用いて実質的にアモルファス状態を保持してポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する方法に関する。ポリヒドロキシアルカノエートは疎水性で優れた生分解性を有し、特に結晶化が抑制されたポリヒドロキシアルカノエートはポリマーコーティング材料として有用である。

【0002】

【従来の技術】ポリヒドロキシアルカノエートは、数多くの微生物のエネルギー貯蔵物質として直径約1ミクロンのグラニューラとして蓄積される。ポリヒドロキシアルカノエートとしては、3-ヒドロキシブチリクアシッドのホモポリマーであるポリヒドロキシブチレートや、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシバリレートのコポリマー、3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシ酪酸のコポリマー等非常に多くのコポリマーが知られている。微生物は、炭素源の豊富な環境でポリヒドロキシアルカノエートを生合成し、資化する炭素源がなくなると、ポリヒドロキシアルカノエートを分解しエネルギー源とする。微生物菌体中ではポリヒドロキシアルカノエートはアモルファス状態で存在し、精製工程での化学的刺激や物理的刺激により結晶化する。微生物によるポリヒドロキシアルカノエートの製造は、微生物を窒素制限下、酸素制限下、もしくは燐制限下で培養し、菌体内にグラニューラとして蓄積させ、菌体からポリヒドロキシアルカノエートを分離して行う。

【0003】現在までに提案されているポリヒドロキシアルカノエートの分離精製方法は、ポリヒドロキシアルカノエートが可溶である溶剤によって菌体からポリヒドロキシアルカノエートを抽出し、その溶液を細胞残渣から分離する方法と、ポリマー以外の細胞物質を酵素処理などにより除去する方法がある。溶剤による精製方法において、抽出溶剤はクロロホルム、塩化メチレン（特開昭57-65193号）、ピリジン（米国特許第3044942号）、ジオキサン（特開昭63-198991号）等が用いられている。しかし、溶剤による抽出方法では、溶剤が仮に再利用のために回収されたとしても回

収率には限界がある。また、単に溶剤抽出だけでは脂質等の不純物も含まれていることが多く、ポリヒドロキシアルカノエートが可溶でない溶剤での予備抽出工程や、選択分離工程などが必要となりコスト高であり、実用性がない。

【0004】一方、ポリマー以外の細胞物質を酵素などにより除去する方法は、J.Gen.Microbiology 19(1958) 198-209 には、微生物細胞を次亜塩素酸ナトリウムのアルカリ性溶液で処理することにより、ポリマーを分離精製する方法が考案されている。また、J.Bacteriology 88(1964)60-71では、微生物細胞懸濁液にリゾチームを添加し、超音波にかけ、グリセロール上に載せ、比重の違いによりポリマーを遠心分離により精製する方法が考案されている。特開昭60-145097号では、熱処理による核酸関係物質の低分子化、アルカラゼ等のタンパク質分解酵素による消化、硫酸ドデシルナトリウム等の界面活性剤による消化法等の組み合わせによる方法を考案している。また、J.A.Ramsay らは、界面活性剤と希薄な次亜塩素酸ナトリウムのアルカリ性溶液で処理する方法を考案している。しかし、これらの方法では、高純度でかつアモルファス状態を保持して精製することは極めて困難である。

【0005】また、この様にして分離精製したポリヒドロキシアルカノエート、特にポリヒドロキシブチレートは、破壊伸びが5%と極めて小さく堅くて脆い材料である。また、ポリヒドロキシブチレートは熱可塑性であるが、加工温度と分解温度が近接しており、非常に熱安定性が悪い。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ポリヒドロキシアルカノエートは菌体内では、アモルファス状態で、分子運動性の良い状態で存在する。しかし、ポリヒドロキシアルカノエートを菌体から分離精製すると、分離精製工程での遠心分離操作や化学的な精製操作、または、乾燥により結晶化する。従来から用いられている分離精製法では、高純度でかつアモルファス状態を保持してポリヒドロキシアルカノエートを精製することは困難である。ポリマー以外の細胞物質を酵素処理などにより除去する方法において、ポリヒドロキシアルカノエートは、ラテックス状に調製されるが、ポリヒドロキシアルカノエートは大部分結晶化している。

【0007】そこで、本発明者らは、結晶化指数を抑制した状態、即ち、実質的にアモルファスを保持した状態でポリヒドロキシアルカノエートを菌体より分離する方法について鋭意検討を重ねた結果、ポリマー以外の細胞物質を酵素処理などにより除去する方法において、精製工程にある条件の界面活性剤を用いることにより、ポリヒドロキシアルカノエートの結晶化を抑制して精製できることを見だし本発明を完成するに至った。

【0008】

【問題点を解決するための手段】すなわち、本発明は、
 (1) ポリヒドロキシアルカノエートを含む微生物
 よりポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する際
 に、界面活性剤を用いてポリヒドロキシアルカノエート
 が実質的にアモルファス状態を保持することを特徴とする
 ポリヒドロキシアルカノエートの分離精製法、(2)
 用いる界面活性剤は、疎水親水性バランス(HLB)が
 25以下であり、濃度が臨界ミセル濃度(CMC)の1
 0倍以上で、酵素反応を阻害しない濃度である(1)記
 載の方法である。

【0009】以下、さらに本発明について詳しく説明す
 る。本発明に用いるポリヒドロキシアルカノエート(P
 HA)とは、代表的にはヒドロキシアルカノエートモノ
 マーにおける炭素数3~12程度のものであり、ポリヒ
 ドロキシアルカノエートのホモポリマーのみでなく、広
 くその共重合体、例えば3-ヒドロキシブチレートと炭
 素数3~12程度のその他のヒドロキシアルカノエート
 との共重合体などをいうことができる。しかし、これら
 に限定することなく、本発明の目的の範囲内であれば広
 く当業者に知られたものを含んでよく、例えば、ポリ
 3-ヒドロキシブチレート、ポリ3-ヒドロ
 キシブチレート、ポリ3-ヒドロキシバリラートおよ
 びポリ3-ヒドロキシオクタノエートなど、ポリ4
 -ヒドロキシブチレートなどが好ましく、特にポリ3
 -ヒドロキシブチレートが好ましい。

【0010】界面活性剤の疎水親水性バランス(以下、
 HLBという)は、界面活性剤が果たす効果を表す指標
 の一つである。界面活性剤の分子内にもつ親水基と疎水
 基のつりあいであり、HLB値が大きいほど親水性が高
 くなる。本発明に用いる界面活性剤は、HLBが25以下
 であり、好ましくは、20以下の界面活性剤である。

【0011】界面活性剤がポリヒドロキシアルカノエート
 グラニュラの表面に吸着し、保護層として働き、ポリ
 ヒドロキシアルカノエートの結晶化を抑制するからであ
 る。ポリヒドロキシアルカノエートグラニュラの表面に
 はHLBの低い界面活性剤ほど吸着しやすい。しかし、
 HLBが25を越えると親水性が強すぎて結晶化抑制効
 果は非常に弱くなる。

【0012】界面活性剤として、アニオン系、ノニオン
 系、もしくはカチオン系でも良く、オレイン酸カリウム
 (HLB20)、オレイン酸ナトリウム(HLB1
 8)、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル
 類のTween20(HLB16.7)、Tween4
 0(HLB16.9)、Tween60(HLB14.
 9)、Tween80(HLB15)、モノラウリン酸エチ
 レン・グリコール(400)エステル(HLB13.
 1)等が挙げられるが、これらに制限されるものではな
 い。

【0013】そして、界面活性剤の濃度は、臨界ミセル
 濃度(以下、CMCという)の10倍以上で、酵素反応

を阻害しない濃度であり、好ましくは、CMCの20倍
 ~100倍である。酵素反応を阻害しない濃度とは、具
 体的には、酵素が界面活性剤によって変性しない濃度
 のことをいう。

【0014】CMCとは、界面活性剤は水溶液中で低濃
 度では分子状に単量体として存在するが、ある濃度以
 上になると分子が急速に会合し、熱力学的に安定な集
 合体いわゆるミセルを形成する。この会合を起こす濃
 度をCMCという。界面活性剤の濃度が、CMC未満で
 あると、ポリヒドロキシアルカノエートの十分な結
 晶化抑制効果が得られないので好ましくない。

【0015】本発明でポリヒドロキシアルカノエート
 が、実質的にアモルファス状態を保持することは、具
 体的には、ポリヒドロキシアルカノエートを含む生
 物よりポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する
 際に、ポリヒドロキシアルカノエートの結晶化指数を5
 %以下に保持することである。実質的にアモルファス
 状態を保持しているポリヒドロキシアルカノエートは、
 コーティング用材料として特に好ましい。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説
 明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0017】実施例1~2、比較例1~2

Alcaligenes eutrophous ATCC 17699 をフルクトースを
 炭素源として窒素制限下で培養し、ポリヒドロキシブチ
 レート含有率約65%の菌体懸濁液を得た。その菌体懸
 濁液を限外濾過装置によりEDTA入り50mMトリス
 塩酸緩衝液に置換した。このポリヒドロキシブチレート
 含有菌体懸濁液(16g/l)にHLB18、CMC
 0.03(w/v)%のオレイン酸ナトリウムを0.1%も
 しくは1.0%添加し、表1に示したpHに調製後、オート
 クレーブ内で加圧下120℃、20分間熱処理を行
 い、核酸等の粘ちょう物質の低分子化を行った。冷却後
 リゾチームを0.05%添加し、30℃にて1時間イン
 キュベートして、細胞壁成分の可溶化を行った。反応
 後、懸濁液を遠心分離機にかけ、固形物を回収した。再
 び、オレイン酸ナトリウム0.1%もしくは1.0%入
 りの50mMトリス塩酸緩衝液に再懸濁し(濃度16g
 /l)、タンパク質分解酵素のプロナーゼを0.1%添
 加し、40℃にて2時間反応させた。

【0018】反応後、遠心分離にて精製されたポリヒド
 ロキシブチレートを回収し、X線結晶回折にて結晶化度
 を評価した。また、回収されたポリヒドロキシブチレ
 ートを100℃にて5時間真空乾燥し、ガスクロマトグラ
 フィーによりポリヒドロキシブチレート純度と吸着オレ
 イン酸ナトリウム量を測定した。結果を表1に示す。本
 発明の効果は、精製されたポリヒドロキシブチレートの
 結晶化指数とポリヒドロキシブチレート純度で評価でき
 る。

【0019】結晶化抑制のための界面活性剤を加えてい

ない無添加系では、精製したポリヒドロキシブチレートは遠心回収等の影響により、高い結晶化指数を示した。しかし、オレイン酸ナトリウム0.1%添加では結晶化抑制の効果は低い、オレイン酸ナトリウム1.0%添加により、顕著に結晶化が抑制されている。用いた界面*

* 活性剤のオレイン酸ナトリウムがポリヒドロキシブチレートグラニューラの表面に吸着し、ポリヒドロキシブチレートの結晶化を抑制している。

【0020】

【表1】

	添加剤	濃度 (%)	結晶化指数 (%)	ポリヒドロキシブチレート 吸着オレイン酸Na(%)	元素分析 N(%)
1	オレイン酸Na	1.0 (pH8)	3	97	0.6
2	オレイン酸Na	1.0 (pH9)	2	96	0.6
3	オレイン酸K	1.0 (pH8)	4	96	0.5
4	オレイン酸K	1.0 (pH9)	3	96	0.5
1	無添加 (pH 8.5)	-	22	93	0.5
2	オレイン酸Na	0.1 (pH8)	17	93	0.4
3	SDS	0.1 (pH 8.5)	20	93	0.5
実施例					
比較例					

【0021】実施例3～4

表1記載のHLB20、CMC0.02(w/v)%のオレイン酸カリウムを用いた以外は、実施例1と同様に実施した。結果を表1に示す。

【0022】比較例3

実施例1と同様の精製方法において、HLB40、CMC0.2(w/v)%の硫酸ドデシルナトリウム(SDS)を添加して精製した。結果を表1に示す。SDSは、ほとんど表面に吸着していないと考えられる。この違いは

オレイン酸NaとSDSのHLB値の違いによるものである。

【0023】実施例5～8、比較例4～5

実施例1と同様にオレイン酸ナトリウムが存在する系で、精製方法を変えて行った。乾燥菌体10g/lのトリス塩酸緩衝液に、TritonX-100濃度1.0%になるように添加し、pH13に調製後、室温20分間往復振とうを行った。反応後、遠心分離にて回収した。洗浄後、トリス塩酸緩衝液に再懸濁し、プロナーゼ濃度0.1%に

なるように添加し、40℃、1時間往復振とうした。これに表2記載のオレイン酸ナトリウム又はオレイン酸カリウムを添加した。

【0024】反応後、遠心分離にて精製されたポリヒドロキシブチレートを回収し、X線結晶回折にて結晶化指数を測定した。また、回収されたポリヒドロキシブチレートを100℃にて5時間真空乾燥し、FT-IRにより残存タンパク質量を測定した。結果を表2に示す。

【0025】これらの系で精製したポリヒドロキシブチレートの残存タンパク質量は、3～4%であった。不純物10はタンパク質が大部分であるので、精製度は表1の精*

*製法での場合と同レベルである。この場合もオレイン酸ナトリウムの添加により結晶化が抑制されているが、その効果は精製方法により異なる。

【0026】比較例6

実施例5と同様の精製方法において、HLB40、CMC0.2(w/v) %の硫酸ドデシルナトリウム(SDS)を添加して精製した。結果を表2に示す。残存タンパク質量は、変わらないが、結晶化抑制の効果が低い。

【0027】

【表2】

		添加剤	濃度 (%)	結晶化指数 (%)	残存タンパク質 (%)
実 施 例	5	オレイン酸Na	1.0 (pH8)	5	3
	6	オレイン酸Na	1.0 (pH9)	4	4
	7	オレイン酸K	1.0 (pH8)	5	3
	8	オレイン酸K	1.0 (pH9)	4	3
比 較 例	4	無添加 (pH 8.5)	—	25	6
	5	オレイン酸Na	0.1 (pH8)	12	3
	6	SDS	0.1 (pH9)	16	3

【0028】測定方法

(1) ポリヒドロキシブチレートの純度、吸着オレイン酸Na量測定方法

菌体内、もしくは精製したポリヒドロキシブチレートの純度の測定方法は、ガスクロマトグラフィーにて行った。操作方法は、乾燥菌体もしくは乾燥ポリヒドロキシブチレート10mgから20mgを秤量し、これをスクリュウキャップ付き試験管に入れた。クロロホルム2mlと、内部標準試薬の安息香酸を0.5%含む3%硫酸入りメタノール溶液2mlを加え、栓をして100℃で4時間反応させた。30分間室温で放置し、室温にまで冷却後、水1mlを加えて10分間激しく振とうした。静置し、2層に分離した下層の有機層をガスクロマトグラフィーにより分析した。安息香酸メチルのピーク面積とヒドロキシ酪酸メチルのピーク面積の比からポリヒドロキシブチレート純度を、安息香酸メチルのピーク面積とオレイン酸メチルの面積の比から吸着オレイン酸Na量をそれぞれ求めた。ガスクロマトグラフィーは、2mのガラスカラムで、充填剤としてReoplex400chromosorb GAW-DMCS 60/80メッシュを使用した。分析温度は、110℃にて1分間保持後、220℃まで毎分15℃の昇温で行い、220℃にて5分間保持した。検量線は、ポ

リヒドロキシブチレート及びオレイン酸メチルの標品により作製した。

【0029】(2) 残存タンパク質の定量方法

①乾燥した精製ポリヒドロキシブチレートグラニュラの窒素含量を、柳本CHNコーダーにて測定した。一般的にタンパク質の窒素含量は約16%であり、精製ポリヒドロキシブチレートの窒素含量を測定することにより残存タンパク質量を求めた。

②FT-IRによってもタンパク質量を測定した。高度に精製したポリヒドロキシブチレートに、リゾチームを添加し、リゾチームの1650cm⁻¹のC=O伸縮振動とポリヒドロキシブチレートのC=O伸縮振動吸収の面積比により検量線を作製した。その検量線に基づき、精製ポリヒドロキシブチレートの残存タンパク質量を定量した。

【0030】(3) ポリヒドロキシブチレートの結晶化度測定方法

ポリヒドロキシブチレートグラニュラの遠心分離したベレット状態(水分約60%)で、X線結晶回折用のガラスの試料台に載せ、フィルムをかぶせ乾燥を防いで測定した。マックスサイエンス MXP-3 にてX線回折測定を行い、結晶ピークとアモルファス部分の割合を数値化し

た。0%は完全にアモルファス状態を示す。一度完全に水分を除いたポリヒドロキシブチレートパウダーを、条件を合わせるために水分60%にて測定すると、結晶化指数は40%となる。

【0031】

【発明の効果】本発明の方法によれば、ポリヒドロキシ

アルカノエートを含有する微生物よりポリヒドロキシアルカノエートを分離精製する際に、ポリヒドロキシアルカノエートの結晶化を抑制して分離精製することができるので、コーティング材料としてより適したものを得ることができる。